

EPH-REZEPTOREN, EPHRINE UND NOTCH BEI DER AUSBILDUNG VON GEWEBEGRENZEN IN HYDRA

Dissertation an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Fakultät für Biologie

von
Susanne Wirnhier
aus München

München, den 28. Januar 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böttger

2. Gutachter: Prof. Dr. U.C. Vothknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen beziehungsweise einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, den 28. Januar 2015

Susanne Wirnhier

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Münder, S., & Böttger, A. (2013). Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*. *The International Journal of Developmental Biology*, 57 (9-10), 759-765.

Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C., A., Prexl, A., Käsbaier, T., & Böttger, A. (2013). Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*. *Developmental Biology*, 383 (1), 146-157.

INHALT

Summary	1
Zusammenfassung	2
1 Einleitung	3
1.1 Der Ephrin-Signalweg	3
1.1.1 Biologische Funktionen des Ephrin-Systems.....	4
1.1.2 Bidirektionale Signaltransduktion modifiziert das Zytoskelett	5
1.1.3 Lösung des Zellkontakts	7
1.2 Die Entwicklung von Zellkommunikationssystemen und ihre ursprünglichen Funktionen	9
1.2.1 <i>Hydra vulgaris</i> als Modellorganismus ursprünglicher mehrzelliger Tiere...	9
1.2.2 Signalwege zur Zellkommunikation in <i>Hydra vulgaris</i>	12
1.3 Ziel der Arbeit	18
2 Ergebnisse	19
2.1 Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden der Klasse B werden an Gewebegrenzen in <i>Hydra vulgaris</i> exprimiert.....	19
2.2 Notch-vermittelte Signaltransduktion wird für die Kopfregeneration sowie die Musterbildung der Tentakel in <i>Hydra</i> benötigt	27
3 Diskussion	46
3.1 Die Evolution der Ephrin-Gene und ihre Expression in <i>Hydra vulgaris</i> .	46
3.2 Genexpressionsmuster implizieren ursprüngliche Funktionen während der Ausbildung von Gewebegrenzen.....	48
3.2.1 Der Ephrin- und der Notch-Signalweg während der Knospung	48
3.2.2 <i>Cis</i> -Inhibierung der Ephrin-Signaltransduktion an den Tentakelbasen	52
3.3 Inhibierung des Notch-Signalwegs durch DAPT und SAHM1	54
4 Ausblick.....	57
5 Anhang	58
5.1 Referenzen	58
5.2 Abkürzungen	65
5.3 Publikationen.....	66
5.4 Erklärung zum Eigenanteil	67
5.5 Danksagung.....	68
5.6 Curriculum Vitae.....	69

Summary

Different ways of intercellular communication developed during the evolution of multicellular animals. The Notch as well as the Eph/ephrin signalling pathway display a mode of communication where both, receptors and ligands, are membrane bound surface molecules. Upon interaction they are able to transduce signals to the inside of two adjacent cells. Studies concerning the basal multicellular animal *hydra vulgaris* were carried out to shed light on the evolutionary formation and the original functions of the Eph/ephrin signalling pathway. It could be shown that the pathway formed early during evolution and that the domain structure of participating proteins remained nearly unaltered. Furthermore, only ephrin ligands type B could be identified in the genome of the freshwater polyp, indicating that this class represents the originally evolved type. *In situ* hybridisation revealed that the mRNAs of the Eph receptors and ephrin ligands are located in the animal's appendages. This indicates an involvement of the Eph/ephrin signalling pathway during boundary formation in *hydra* comparable to the Notch signalling pathway. The Notch pathway is necessary to separate the tissue of the bud from the tissues of the parent animal. Further studies investigated if Notch is also involved in the formation of boundaries within the head structures of the animals. The usage of two different pharmacological inhibitors showed that Notch inhibits the formation of tentacle tissue outside the tentacle areas. During head regeneration Notch signalling results in cell sorting of hypostomal and tentacle precursor cells into separate zones.

Zusammenfassung

Während der Entwicklung von mehrzelligen Tieren haben sich verschiedene Wege der interzellulären Kommunikation ausgebildet. Der Notch- sowie auch der Ephrin-Signalweg basieren auf einem System, bei dem es sich sowohl bei den Rezeptoren als auch bei den Liganden um membranständige Oberflächenmoleküle handelt. Durch gegenseitige Interaktion können Signale ins Innere zweier benachbarter Zellen weitergeleitet werden. Untersuchungen am basalen Mehrzeller *Hydra vulgaris* sollten Einblicke in die entwicklungsgeschichtliche Entstehung und die ursprünglichen Funktionen des Ephrin-Signalwegs geben. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Kommunikationssystem der Eph-Ephrine schon sehr früh entstanden ist und dass sich die Domänenstruktur der Proteine seither kaum verändert hat. Des Weiteren konnte die Theorie unterstützt werden, dass es sich bei der Ligandenklasse B um den ursprünglichen Typus handelt, da in *Hydra* ausschließlich diese Klasse von Liganden identifiziert wurde. *In situ* Hybridisierungsreaktionen ergaben, dass die mRNAs der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden jeweils in den Körperanhängen (Knospen und Tentakel) der Tiere lokalisiert sind. Die Genexpressionen liefern Hinweise darauf, dass der Ephrin-Signalweg in *Hydra* an der Ausbildung von Gewebegrenzen beteiligt ist, so wie es auch für den Notch-Signalweg der Fall ist. Dieser ist dazu notwendig, die Knospe vom Elterntier abzulösen. Untersuchungen am basalen Süßwasserpolyphen sollten klären ob der Notch-Signalweg auch an der Ausbildung von Gewebegrenzen am Kopf der Tiere beteiligt ist. Durch die Anwendung von zwei unterschiedlichen pharmakologischen Hemmstoffen konnte gezeigt werden, dass Notch im adulten Kopf die Ausbildung von Tentakelgewebe außerhalb des dafür vorgesehenen Bereichs hemmt. Im Verlauf der Kopfregeneration bewirkt die Signalweiterleitung durch Notch eine Sortierung von Hypostom- und Tentakelvorläuferzellen in zwei verschiedene Teilbereiche.

1 Einleitung

1.1 Der Ephrin-Signalweg

Im Laufe der Evolution von einzelligen zu vielzelligen Organismen mussten sich Mechanismen entwickeln mit deren Hilfe die Zellen miteinander kommunizieren konnten. Dabei haben sich unterschiedliche Systeme ausgebildet. Zum einen können Zellen mit anderen Zellen in Kontakt treten indem sie Signalmoleküle produzieren und durch Exozytose in ihre Umgebung freigeben. Auf diese Weise können Signale an Zellen des direkten Umfelds (parakrin) oder auch in einiger Entfernung (endokrin) weitergegeben werden. Eine andere Möglichkeit der interzellulären Kommunikation stellt die Signalweiterleitung durch membrangebundene Proteine dar. Dabei können Wechselwirkungen zwischen direkt benachbarten Zellen auftreten.

Ein Kommunikationssystem dieser Art stellen die Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden dar. Eph-Rezeptoren sind die größte Klasse innerhalb der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Bis heute sind 15 Rezeptoren und 9 unterschiedliche Liganden bekannt (Eph-Nomenclature-Committee, 2001). Der erste Eph-Rezeptor wurde im Jahre 1987 aus einer Leberzelllinie („erythropoietin-producing hepatocellular cell line“) isoliert, aus welcher auch der Name des neu entdeckten Rezeptors abgeleitet wurde (Hirai *et al.*, 1987). Sieben Jahre später konnten die zugehörigen Liganden (Ephrine) identifiziert werden (Bartley *et al.*, 1994). Die Liganden und Rezeptoren untergliedern sich in zwei Subtypen. Liganden der Klasse A sind durch einen GPI-Anker in der Membran verankert und binden hauptsächlich Klasse A-Rezeptoren. Ephrin-B Liganden weisen statt dem GPI-Anker einen kurzen intrazellulären Abschnitt auf und binden bevorzugt an Klasse B-Rezeptoren.

1.1.1 Biologische Funktionen des Ephrin-Systems

Bei der Entwicklung von Wirbeltieren übt der Ephrin-Signalweg verschiedene Funktionen aus. Er verursacht eine veränderte Morphologie, Zellmigration oder gegenseitige Abstoßung der Zellen voneinander (Klein, 2012).

Der Signalweg ist für die gerichtete Wegfindung von Axonen und somit für die Entwicklung des Nervensystems notwendig. Bei der Entstehung der retinotopischen Karte bildet sich eine Verbindung zwischen der Netzhaut und dem Mittelhirndach (*Tektum* bzw. *superior colliculus*) aus. Die Axone behalten beim Erreichen der Zielsstruktur ihre relative Lage zueinander bei. Axone des nasalen Bereichs der Netzhaut enden im posterioren und Axone des temporalen Bereichs der Netzhaut enden im anterioren Teil des *Tektums*. Graduierte Genexpressionen von Eph-Rezeptoren in der Netzhaut und Ephrin-Liganden im *Tektum* lenken die Axone zu ihrem Ziel (siehe Übersichtsartikel (Klein, 2012)). Genexpressionen der Eph-Rezeptoren und Ephrine sind auch für die axonale Wegfindung bei der Ausbildung des kortikospinalen Trakts, einer Verbindung zwischen dem *Neocortex* im Gehirn und dem Rückenmark, notwendig ((Dottori *et al.*, 1998), (Kullander *et al.*, 2001)).

Die Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden spielen auch für die Entwicklung des Blutgefäßsystems eine bedeutende Rolle. Sie sind sowohl in die Prozesse der Vaskulogenese, der postnatalen Angiogenese, der Tumorangio-genese als auch der Wundheilung involviert (Mosch *et al.*, 2010). Schon in frühen Entwicklungsstufen exprimieren die arteriellen endothelialen Zellen den Liganden *Ephrin-B2* und die venösen endothelialen Zellen den Rezeptor *EphB4* (Wang *et al.*, 1998). Die Interaktion der Membranproteine führt zu einer Verschmelzung der Kapillaren, wodurch ein hierarchisch organisiertes System mit unterschiedlich großen Gefäßen entsteht. Insbesondere die Signalweiterleitung durch den Liganden Ephrin-B2 ist wichtig für diese Remodellierung des primären Gefäßgeflechts (Adams *et al.*, 2001).

Das Ephrin-System kann auch eine Sortierung und Positionierung von Zellen bewirken. Dabei spielt es bei der Ausbildung von Gewebegrenzen während der Hirnentwicklung und der Somitogenese eine bedeutende Rolle (Holder and Klein, 1999). Eine aufeinander abgestimmte Genexpression von Rezeptoren und Liganden bewirkt, dass sich zuvor vermischte Zellen sortieren. Die Auftrennung der

unterschiedlichen Zellpopulationen führt dazu, dass sich scharfe Grenzen zwischen ihnen ausbilden (siehe Übersichtsartikel (Battle and Wilkinson, 2012), (Klein, 2012)).

1.1.2 Bidirektionale Signaltransduktion modifiziert das Zytoskelett

Die vom Ephrin-Signalweg vermittelte Migration oder die Veränderung der Zellform wird durch eine Modifikation des Zytoskeletts in beiden Zellen erreicht (Klein, 2012). Das Ephrin-System besitzt die Fähigkeit zur bidirektionalen Signaltransduktion. Signale können also sowohl vom Rezeptor als auch von den Liganden ins Zellinnere weitergegeben werden.

Die Weiterleitung von Signalen durch die Rezeptoren wird durch die Bindung von Molekülen an den intrazellulären Teil vermittelt. Die Aktivierung des Rezeptors und die darauf folgende Tyrosin-Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teils führt zur Etablierung von Bindestellen für nachgeschaltete Signalmoleküle mit SH2-Domäne. Die Bindung von Adapterproteinen kann auch über das C-terminal gelegene PDZ Motiv oder direkt an die Tyrosinkinasedomäne erfolgen. Die Signalweiterleitung durch die Eph-Rezeptoren beeinflusst die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts über die Regulation von kleinen GTPasen. Unterschiedliche Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) binden an die Tyrosinkinasedomäne der Eph-Rezeptoren. Der GEF Ephexin bindet an Klasse A-Rezeptoren und aktiviert die kleine GTPase RhoA. An die Tyrosinkinasedomäne von EphB Rezeptoren binden die GEFs Kalirin und Intersectin, was zur Aktivierung von Rac beziehungsweise Cdc42 führt (Noren and Pasquale, 2004). Diese drei Moleküle gehören zur Familie der Rho-GTPasen. Sie können zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen Konformation und einer inaktiven, GDP-gebundenen Konformation hin und her wechseln. Rho, Rac und Cdc42 sind bekannte Modulatoren des Aktin-Zytoskeletts und beeinflussen die Ausbildung von Stressfasern (Rho) sowie die Entwicklung von Lamellipodien (Rac) und Filopodien (Cdc42), was sich wiederum auf die Form und die Bewegung von Zellen auswirkt (Nobes and Hall, 1995), (Hall, 1998), (Kullander and Klein, 2002), (Murai and Pasquale, 2003).

Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts können auch durch die reverse Signaltransduktion vermittelt werden. Klasse B Ephrin-Liganden erfahren wie die Rezeptoren nach der Bindung eine Phosphorylierung von zytoplasmatischen Tyrosinresten. Da die Liganden selbst keine Kinasedomäne besitzen, werden hierfür zytosolische Kinasen der Src-Familie rekrutiert (Palmer *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung der Tyrosinreste führt zu einer Konformationsänderung der C-terminalen Haarnadelstruktur der Liganden und damit ebenfalls zu einer Etablierung von SH2-Bindestellen wie bei den Rezeptoren (Song *et al.*, 2002). Grb4 ist ein Adaptermolekül, welches an diese Stelle bindet (Cowan and Henkemeyer, 2001). Es besitzt eine SH2 und drei SH3 Domänen. Grb4 initiiert eine Signalkaskade über mehrere Proteine. Es kommt zur Interaktion mit dem Gerüstprotein Axin, dem „Abl-interacting protein-1“ (Abi-1) und dem „c-Cbl-associated protein“ (CAP). CAP reguliert die Bildung von Stressfasern (Ribon *et al.*, 1998) und auch die Interaktion von Abi-1 mit der Tyrosinkinase Abl („Abelson murine leukemia viral oncogene homolog“) bewirkt Modifikationen des Aktin-Zytoskellets (zusammengefasst von (Kullander and Klein, 2002)). Neben der Rekrutierung von Adapterproteinen wie Grb4 gibt es auch Hinweise darauf, dass Ephrin-Liganden einen regulatorischen Einfluss auf GTPasen der Rho-Familie haben (Tanaka *et al.*, 2003). Nach der Aktivierung durch einen Rezeptor bindet die Phosphatase PTP-BL mit leichter zeitlicher Verzögerung an das PDZ Motiv des Ephrin-Liganden. PTP-BL dephosphoryliert den zytoplasmatischen Teil des Ephrin-B und inaktiviert die Kinase Src. Dadurch stellt die Phosphatase einen negativen Regulationsmechanismus der phosphorylierungsabhängigen Signalweiterleitung dar und es kann zwischen phosphorylierungsabhängiger und -unabhängiger Signaltransduktion umgeschaltet werden (Palmer *et al.*, 2002).

Durch die verschiedenen Bindungsmöglichkeiten ist das Spektrum an Adaptermolekülen breit gefächert und viele unterschiedliche Proteine sind in der Lage an den intrazellulären Teil der Rezeptoren und Liganden zu binden. Die daraus resultierenden Effekte der Signalweiterleitung sind dementsprechend vielfältig. Neben direkten Einflüssen auf das Zytoskelett kann also auch Adhäsion, De-Adhäsion oder Zellmigration eine Folge der Signaltransduktion sein.

So bindet zum Beispiel PDZ-RGS3 an das PDZ Motiv von Ephrin-B Liganden. PDZ-RGS3 ist ein GTPase-aktivierendes Molekül (GAP), welches die Hydrolyse von GTP zu GDP in der α -Untereinheit von trimeren G-Proteinen vermittelt. Die Signalweiterleitung durch PDZ-RGS3 kann unterschiedliche Auswirkungen haben. Sie beeinflusst zum Beispiel eine vom Chemokin SDF-1 induzierte Chemotaxis (Lu *et al.*, 2001) und führt im Krallenfrosch zur De-Adhäsion von embryonalen Zellen (Jones *et al.*, 1998). Veränderungen der Zelladhäsion können auch von den Eph-Rezeptoren vermittelt werden. Die Auswirkungen sind dabei abhängig von der jeweiligen Art der Zellen und des aktivierten Rezeptors. Die Signaltransduktion kann sowohl verstärkte als auch verminderte Integrin-abhängige Zelladhäsion bewirken. Diese Änderungen werden zum Beispiel durch Dephosphorylierung der FAK („focal adhesion kinase“) (Miao *et al.*, 2000) oder Interaktion mit dem „low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase“ (LMW-PTP) ausgelöst (Stein *et al.*, 1998). Daneben haben Eph-Rezeptoren auch einen Einfluss auf die Proliferation von Zellen. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen üben sie zumeist inhibitorische Effekte aus. Dies geschieht durch die Hemmung von Ras-Proteinen und der sich daran anschließenden MAP-Kinase Kaskade, welche sonst zur Aktivierung der Proliferation führt (Elowe *et al.*, 2001), (Miao *et al.*, 2001).

1.1.3 Lösung des Zellkontakts

Die zellulären Antworten der Ephrin-vermittelten Signaltransduktion führen oft zur gegenseitigen Abstoßung von benachbarten Zellen oder ganzen Zellpopulationen. Für die Aktivierung des Signalwegs ist aber zunächst ein enger Kontakt mit starker Bindung zwischen den Zellen notwendig. Damit diese auseinanderweichen können muss es demnach einen Mechanismus geben, der die Bindung von Rezeptor und Ligand und somit auch die Zellen selbst voneinander löst. Bislang sind zwei Prozesse bekannt, welche die Aufhebung der Bindung vermitteln können. Die Metalloproteasen der ADAM („a disintegrin and metalloproteinase“)-Familie sind in der Lage, Ephrin-Liganden beider Klassen in *trans* und *cis* zu prozessieren. Auch die Rezeptoren können durch ADAM-Metalloproteasen geschnitten werden. Des

Weiteren können sowohl Ligand als auch Rezeptor von der γ -Sekretase prozessiert werden (Tomita *et al.*, 2006), (Litterst *et al.*, 2007). Die Moleküle werden durch die Prozessierungen von der Zelloberfläche entfernt, wodurch die Verbindung der Zellen gelöst wird (siehe Abbildung 1).

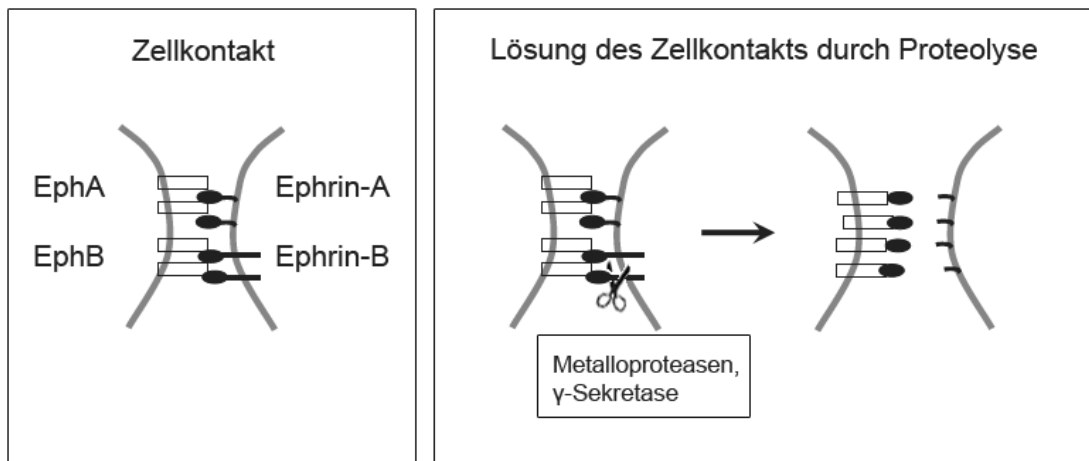


Abbildung 1: Proteolyse der Oberflächenmoleküle durch Metalloproteasen und die γ -Sekretase ermöglicht das Auseinanderweichen von zuvor verbundenen Zellen (verändert nach (Noren and Pasquale, 2004)).

Eine zweite Möglichkeit wird durch Endozytose vermittelt. Hierbei wird der gesamte Komplex aus Rezeptor und Ligand endozytiert und somit von der Zelloberfläche entfernt. Der Komplex kann dabei entweder von der Zelle, die den Liganden trägt, oder von der Rezeptor-tragenden Zelle endozytiert werden ((Jurney *et al.*, 2002), (Marston *et al.*, 2003), (Zimmer *et al.*, 2003)).

1.2 Die Entwicklung von Zellkommunikationssystemen und ihre ursprünglichen Funktionen

Das System der Eph-Ephrine existiert in zahlreichen höher entwickelten Organismen. Neben dem Menschen befindet es sich auch in zahlreichen weiteren Wirbeltieren wie Ratten, Mäusen, Wallabys, Hühnern, Krallenfröschen oder Zebrafischen. Es kommt ebenfalls in Gliederfüßern wie der Fruchtfliege sowie Fadenwürmern vor (vgl. (Drescher, 2002)). Zu welchem Zeitpunkt das Kommunikationssystem der Eph-Ephrine in der Evolution entstanden ist und welche Funktionen es ursprünglich ausübte, ist bislang nicht aufgeklärt.

Zur Untersuchung des evolutionären Ursprungs bietet sich die Betrachtung von sehr basalen vielzelligen Tieren an. Im Genom des Schwamms *Ephydatia fluviatilis* existiert ein Gen für einen Eph-Rezeptor (GenBank accession number: BAA81719.3). Da Schwämme im Gegensatz zu höher entwickelten Tieren noch keine echten Gewebe besitzen sind die Ephs demnach schon vor dem Übergang von Gewebelosen zu Gewebetieren entstanden. Im Genom des Placozoen *Trichoplax adhaerens* befindet sich ein bruchstückhaftes Genmodell von welchem anzunehmen ist, dass es einen Eph-Rezeptor kodiert (GenBank accession number: EDV28075.1).

1.2.1 *Hydra vulgaris* als Modellorganismus ursprünglicher mehrzelliger Tiere

Das Nesseltier *Hydra vulgaris* eignet sich besonders gut um die Evolution früher mehrzelliger Tiere zu verstehen. Der Stamm der Cnidaria existiert schon seit dem späten Präkambrium und untergliedert sich in fünf Unterklassen: die Anthozoa (Korallen und Seeanemonen), die Cubozoa (Würfelquallen), die Scyphozoa (Schirmquallen), die Staurozoa (Stielquallen) und letztlich die Hydrozoa, zu welchen auch *Hydra vulgaris* zählt (zusammengefasst von (Steele *et al.*, 2011)). Die Tiere gehören zum Reich der Metazoa und zur Abteilung der Eumetazoa. Sie besitzen also im Gegensatz zu Schwämmen echte Gewebe. Dennoch sind sie in ihrer Bauart eher

einfach. Die Tiere besitzen kein Mesoderm und haben nur eine Achse. Ihr radiärsymmetrischer Körper unterteilt sich in einen apikalen Kopf, eine zylindrische Körpersäule und einen Fuß. Den Abschluss des Fußes bildet die sogenannte Basalscheibe, mit der sich die Tiere an Substrat anheften können (siehe Abbildung 2). Der zylindrisch gebaute Körper besteht aus zwei Epithelschichten: den inneren endodermalen und den äußeren ektodermalen Epithelzellen. Diese beiden Zellschichten sind durch eine Art Basallamina, die sogenannte Mesoglea, voneinander getrennt. Der Kopf des Tieres kann in die Mundöffnung, das sog. Hypostom, und einen darunter liegenden Tentakelkranz unterteilt werden. Innerhalb der Tentakel befinden sich Batteriezellen und Nematocyten, welche charakteristisch für die Cnidaria sind. Mit Hilfe dieser Nesselzellen kann Beute gefangen, festgehalten und in die Mundöffnung transferiert werden.

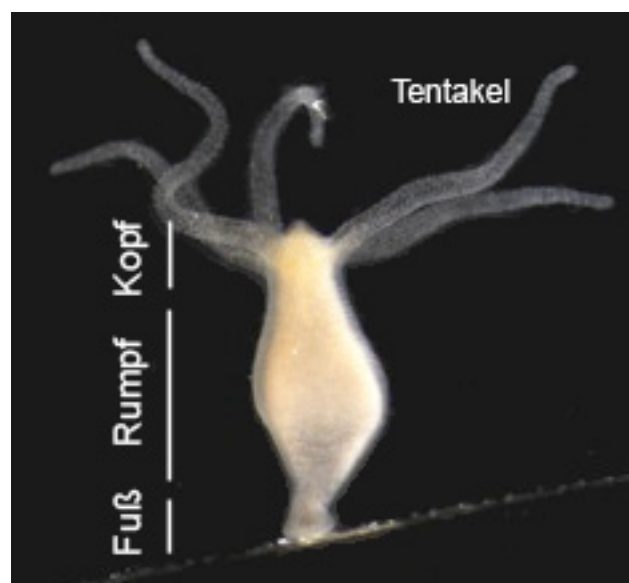


Abbildung 2: Der Körperbau des Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris*.

Die Süßwasserpolyphen können sich sexuell oder asexuell fortpflanzen. Unter geeigneten Bedingungen findet die Reproduktion hauptsächlich asexuell durch Knospung statt. Hierbei wächst ein neuer Polyp aus einer Zone im unteren Drittel der Körpersäule des Elterntieres aus. Der Prozess beginnt mit einer leichten Verdickung der Epithelzellen und einer darauf folgenden Ausstülpung des Gewebes. In den

nächsten Entwicklungsschritten wächst die Knospe immer weiter aus. Es bilden sich erste Tentakelspitzen, die ebenfalls immer weiter auswachsen. Anschließend beginnt die Knospe sich an ihrer Basis einzuschnüren. Diese Einschnürung verengt sich zunehmend bis sich der Polyp schließlich vollständig vom Elterntier trennt. In diesem finalen Schritt bildet der basale Teil der Knospe außerdem fußspezifische Zellen aus. Das heißt es wird eine Basalscheibe generiert, mit der sich der neue Polyp selbständig an Substrat anheften kann (Otto and Campbell, 1977).

Der Süßwasserpolyp stellt weiterhin ein einfaches System dar, um Entwicklungsprozesse im adulten Tier zu verfolgen. Alle Zelltypen des Tieres gehen aus drei proliferierenden Zelllinien hervor: den endodermalen- und ektodermalen Epithelzellen sowie den interstitiellen Zellen („I-Zellen“). Diese drei Linien sind selbsterneuernd und bilden dadurch ihren eigenen Stammzellpool. Die epithelialen Zellen machen den Hauptteil der Körpersäule aus. Sie werden entlang der Achse des Tieres verschoben, differenzieren an den Extremitäten der Tiere zu fuß- oder tentakelspezifischen Zellen aus und können im Laufe der Zeit auch abgeschilfert werden. Durch diesen Prozess befinden sich die Zellen des Tieres in einem fließenden Gleichgewicht des kontinuierlichen Zellverlusts sowie auch einer ständigen Neubildung und Differenzierung von Zellen (Campbell, 1967).

Eine Folge dieser Gewebedynamik ist die außergewöhnliche Regenerationsfähigkeit der Tiere. Fehlende Körperteile können bei Verlust komplett wiederhergestellt werden. Die Regeneration des Kopfes ist dabei ein stark untersuchter Vorgang. Trennt man einem Tier den Kopf unterhalb des Tentakelkranzes ab, so strecken sich innerhalb der folgenden drei bis sechs Stunden die Epithelien über die Wunde und verschließen sie so. Die dadurch entstandene regenerierende Kappe entwickelt nach 30 bis 36 Stunden erste Tentakelknospen. Nach 48 bis 72 Stunden hat sich wieder ein vollständiger Kopf gebildet (zusammengefasst von (Bode, 2003)).

1.2.2 Signalwege zur Zellkommunikation in *Hydra vulgaris*

Um die Strukturen des Tieres trotz der ständig präsenten Gewebedynamik aufrecht erhalten zu können, müssen die Signalwege, welche die Position und den Differenzierungsweg aller Zellen bestimmen, auch im adulten Polypen angeschaltet sein. Trotz ihrer evolutionären Distanz weisen die im Genom des Süßwasserpolyphen verschlüsselten Gene erstaunliche Ähnlichkeit zu ihren homologen Vertretern aus höheren Wirbeltieren auf.

1.2.2.1 Der Wnt-Signalweg

Beim Wnt-Signalweg handelt es sich um ein endo- bzw. autokrines Kommunikationssystem. Dabei produzieren und sezernieren signalsendende Zellen das Wnt-Protein. Dieses wirkt als Ligand und bindet an den extrazellulären Teil des Rezeptors „Frizzled“ auf der Oberfläche einer signalempfangenden Zelle. Dabei kann es sich auch um ein und dieselbe Zelle handeln (autokrin). Die Bindung des Liganden löst eine Kaskade von Protein-Protein-Interaktionen aus, die zur Akkumulation von β -Catenin und zur Transkription von Zielgenen führt. Der Wnt-Signalweg trägt bei der Entwicklung von höheren Tieren zur Ausbildung der anterior-posterioren Achse bei. Im Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* bewirkt er die Ausbildung der oral-aboralen Achse (Hobmayer *et al.*, 2000). Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs wie *HyWnt3* oder *Hy β Catenin* stellen dabei einen Teil eines lokalen Organisators dar (Lengfeld *et al.*, 2009), (Gee *et al.*, 2010), (Broun *et al.*, 2005). Dieser Organisator ist im oberen Teil des Hypostoms des Süßwasserpolyphen lokalisiert und ist vergleichbar mit einem embryonalen Organisator (Zusammenfassung (Bode, 2012)). Durch Transplantationsexperimente wurde sichtbar, dass er die Ausbildung eines Kopfes inklusive einer sekundären Achse induziert (Browne, 1909), (Broun and Bode, 2002). Der Wnt-Signalweg ist folglich auch an den Prozessen der Knospung sowie der Kopfregeneration beteiligt (Hobmayer *et al.*, 2000), (Lengfeld *et al.*, 2009).

1.2.2.2 Signaltransduktion durch BMP und Nodal

Neben dem Wnt-Signalweg sind Proteine der BMP-Familie sowie Nodal für die Ausbildung der drei Achsen in bilateralen Tieren verantwortlich. BMP („bone morphogenetic protein“) ist dabei in die Ausbildung einer dorso-ventralen Achse involviert und Nodal beeinflusst die Etablierung von lateralen (rechts-links) Achsen. Obwohl der Körperbau des pre-bilateralen Polypen *Hydra* durch radiäre Symmetrie gekennzeichnet ist, sind Gene des BMP und des Nodal-Signalwegs in seinem Genom vorhanden (Watanabe *et al.*, 2014). Während die Gene des kanonischen Wnt-Signalwegs im apikalen Teil des adulten Tieres und der Knospen exprimiert werden, so ist das zum TGF- β Signalweg gehörende Gen *HyBMP5-8* jeweils im unteren Teil der Körpersäule sowie an den Tentakelbasen exprimiert (Reinhardt *et al.*, 2004). Zur Ausbildung der Achsen trägt auch *Ndr* („nodal-related“) bei, welches ein in *Hydra* identifiziertes homologes Gen für *Nodal* ist. Das Gen wird in frühen Stadien der Knospung exprimiert, also einem Prozess, bei dem eine zweite, laterale Achse ausgebildet wird. Die Autoren vermuten, dass das System zur Ausbildung von Achsen schon vor dem ersten bilateralen Tier entstanden ist und für die spätere Entwicklung modifiziert wurde (Watanabe *et al.*, 2014).

1.2.2.3 Der Notch-Signalweg

Ein weiteres Zellkommunikationssystem, welches im Süßwasserpolyphen konserviert vorliegt, ist der Notch-Signalweg. Beim Notch-Rezeptor sowie seinen Liganden handelt es sich wie bei den Eph-Ephrinen um membranständige Zelloberflächenmoleküle. Die Signalweiterleitung durch Notch ist dadurch in der Lage, die Schicksale zwischen benachbarten Zellen zu verknüpfen. Sie spielt hauptsächlich bei der lateralen Inhibition, der Zellliniendetermination und bei der Ausbildung von Gewebegrenzen eine Rolle (siehe Übersichtsartikel (Bray, 2006)). Die Signaltransduktion hat Auswirkungen auf die Proliferation, die Differenzierung oder auch auf apoptotische Zellschicksalsentscheidungen. Die Effekte variieren dabei je nachdem, in welchem Umfeld sich die Zellen befinden (Hori *et al.*, 2013). Die Bindung von Liganden auf der Oberfläche von benachbarten Zellen bewirkt eine Prozessierung des Notch-Rezeptors durch eine Metalloproteinase (*TACE* „tumor

necrosis factor α -converting enzyme“ bzw. ADAM). Sobald der Rezeptor an dieser Stelle geschnitten wurde, erfolgt eine Prozessierung durch die Presenilin Untereinheit der γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne. Dadurch wird der intrazelluläre Teil des Rezeptors befreit und aufgrund der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) in den Zellkern transloziert. Die Notch-intrazelluläre-Domäne (NICD) bildet dort einen Komplex mit dem DNA-bindenden Protein CSL (C_{BF}1 (*Homo sapiens*), S_{uppressor of Hairless} (*D. melanogaster*), L_{ag}1 (*C. elegans*)) sowie Mastermind (Mam). Dies führt zur Expression von Notch Zielgenen (zusammengefasst von (Hori *et al.*, 2013)).

In *Hydra vulgaris* ist der Notch-Signalweg notwendig für die post-mitotische Nematozytendifferenzierung sowie die Ausbildung von Gewebegrenzen (Käsbauer *et al.*, 2007), (Münder *et al.*, 2010). Neben dem Notch-Rezeptor besitzen die Tiere auch einen Liganden *HyJagged* (Prexl *et al.*, 2011) sowie einige Moleküle die zur Regulation und Modifikation der Signaltransduktion beitragen. Unter anderem konnten homologe Gene für *Presenilin* (Käsbauer *et al.*, 2007) identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor *HyHes* konnte durch Promotoranalysen als Zielgen von *HvNotch* in Zellen des Süßwasserpolyphen nachgewiesen werden (Münder *et al.*, 2010). *HyHes* wird an der Knospenbasis exprimiert und geht der Bildung einer Fußscheibe der Knospe voraus.

Für das Studium des Notch-Signalwegs und seiner Funktionen in *Hydra vulgaris* wurde bisher der Inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenylacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t-butyl ester) verwendet. Der synthetisch hergestellte Hemmstoff inhibiert die Presenilin Untereinheit der γ -Sekretase. Dadurch kann der Rezeptor nicht mehr geschnitten und die NICD nicht mehr in den Zellkern transloziert werden (Käsbauer *et al.*, 2007). DAPT wird auch bei anderen Modellorganismen erfolgreich zur Untersuchung des Notch-Signalwegs eingesetzt. Im Zebrafisch (Geling *et al.*, 2002) und der Fruchtfliege (Micchelli *et al.*, 2003) konnte bereits gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung durch DAPT zu vergleichbaren Phänotypen führt, wie sie bei Notch-„loss of function“-Mutationen auftreten.

In *Hydra vulgaris* führt die Inhibierung des Signalwegs durch DAPT zu Defekten in der post-mitotischen Differenzierung von Nematozyten (Käsbauer *et al.*, 2007) sowie

zu einer Störung des Knospungsprozesses. Die Knospen können sich an ihrer Basis nicht mehr einschnüren und es entstehen sogenannte Y-Tiere mit zwei Köpfen (Dissertation Tina Käsbauer und (Münder *et al.*, 2010)). Eine DAPT-Behandlung der Tiere verhindert die Expression von *HyHes*, die Bildung eines Fußes sowie die Trennung der Knospe vom Elterntier. Im Bereich der Knospenbasis kommt es zu einer Störung des Genexpressionsmusters. Der FGF-Rezeptor *Kringelchen* ist nur noch versprenkelt exprimiert und verliert seine ansonsten scharfe Begrenzung. Die Expression weiterer Gene, wie die der Matrixmetalloprotease *MMP-A3*, findet gar nicht mehr statt (Münder *et al.*, 2010). Aktive Notch-Signaltransduktion ist demnach notwendig für die klare Definierung des Expressionsmusters im Bereich der Grenzzellen zwischen Knospe und Elterntier.

DAPT hemmt den Notch-Signalweg zwar effektiv, diese Hemmung geschieht jedoch aufgrund einer Inhibierung des Presenilins. Die Blockierung der γ -Sekretase kann demnach zu Nebeneffekten führen, da Presenilin neben dem Notch-Rezeptor auch zahlreiche weitere Substrate schneidet (Haapasalo and Kovacs, 2011). Für die Untersuchung des Notch-Signalwegs in *Hydra* stellt der neu entwickelte Hemmstoff SAHM1 „stapled alpha-helical peptides derived from MAML1“ (Moellering *et al.*, 2009) eine interessante Alternative zum bisher verwendeten DAPT dar. Der Inhibitor setzt an einer zweiten Stelle innerhalb des Signalwegs an, wodurch alte Ergebnisse überprüft und neue Erkenntnisse gewonnen werden können (siehe Abbildung 3).

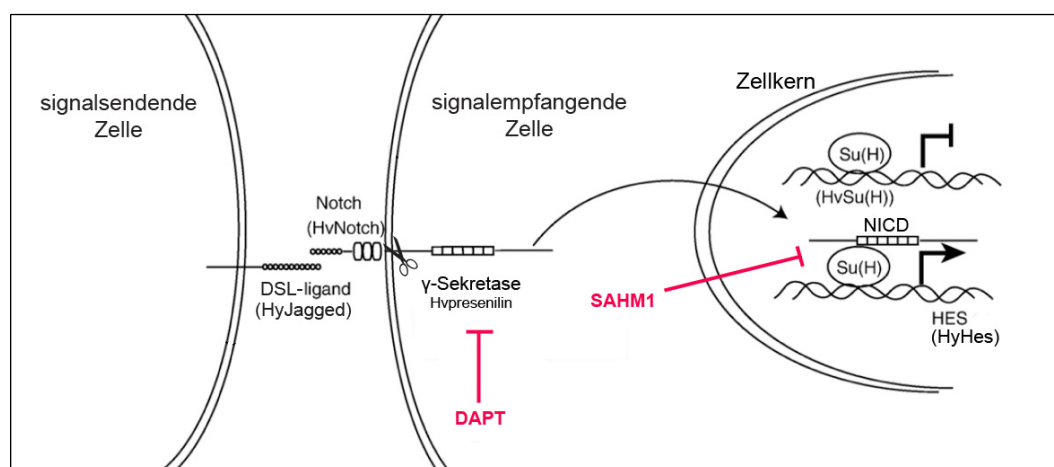


Abbildung 3: Darstellung der unterschiedlichen Angriffspunkte der Inhibitoren DAPT und SAHM1 im Notch-Signalweg von *Hydra vulgaris* (Abbildung verändert nach (Käsbauer *et al.*, 2007)).

Moellering und Kollegen hatten das Ziel einen spezifischeren Hemmstoff des Notch-Signalwegs zu entwickeln, um in der therapeutischen Anwendung der Stoffe die sonst üblichen Nebenwirkungen zu vermeiden. Bei SAHM1 handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes, zellpermeables, stabilisiertes, alpha-helikales Peptid. Dieses Peptid wurde so entworfen, dass es einen 16 Aminosäuren langen Teilbereich des „Mastermind-like 1“ (Maml1) Proteins nachahmt (siehe Abbildung 4). Auf diese Weise wird die kritische Protein-Protein Berührungsfläche des Notch-Transaktionskomplexes erkannt und blockiert. Die Bindung von SAHM1 anstelle von Maml1 verhindert damit die Zusammenlagerung des aktiven, dreiteiligen Komplexes bestehend aus der NICD, CSL und Maml1.

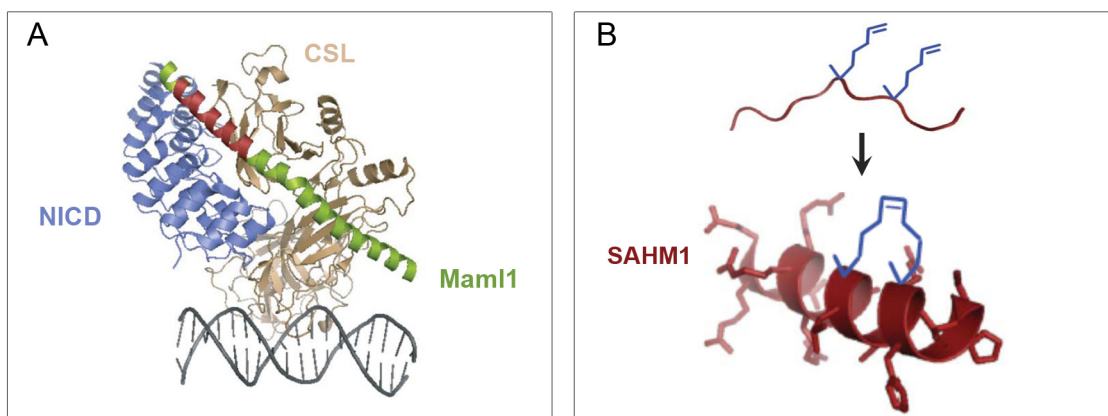


Abbildung 4: (A) Kristallstruktur des ternären Komplexes bestehend aus der NICD, CSL und Maml1. Ausgehend vom rot markierten Bereich des Mastermind-like1 wurde das Peptid SAHM1 entworfen. **(B) Darstellung des stabilisierten SAHM1 „stapled alpha-helical peptides derived from MAML1“.** An die Peptidkette wurden zwei unnatürliche Alken-Aminosäuren hinzugefügt, welche durch Alkenmetathese miteinander verknüpft wurden (blaue Linien). Durch diese Verbindung wird das Peptid in einer helikalen Form gehalten (verändert nach (Moellering *et al.*, 2009)).

Die Untersuchungen von Moellering und Kollegen konnten die Wirkung des von ihnen entwickelten Hemmstoffs in einer Studie belegen. Übermäßige Signalweiterleitung durch Notch spielt zum Beispiel bei der akuten lymphatischen T-Zell Leukämie (T-ALL) eine Rolle. In der Studie wurde gezeigt, dass durch SAHM1

die Bildung des aktiven Transkriptionskomplexes verhindert wird. Die Anwendung von SAHM1 auf leukämische Zellen führte zu verminderter Expression zahlreicher Notch-aktivierter Gene. In Zellkultur sowie in einem Mausmodell für Notch1-gesteuerte T-ALL konnten negative Auswirkungen auf die Zellproliferation und damit eine erfolgreiche Inhibierung gezeigt werden (Moellering *et al.*, 2009).

1.3 Ziel der Arbeit

Das Signaltransduktionssystem der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden ist für die Entwicklung von vielzelligen Tieren notwendig. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Komponenten des Ephrin-Signalwegs im basalen Mehrzeller *Hydra vulgaris* existieren. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die evolutionäre Entstehung dieses Kommunikationssystems. Im Weiteren sollte untersucht werden ob die mRNA-Lokalisation Hinweise auf ursprüngliche Funktionen des Ephrin-Systems geben kann. Es stellte sich heraus, dass die im Süßwasserpolyphen identifizierten homologen Gene des Ephrin-Signalwegs offenbar an der Ausbildung von Gewebegrenzen beteiligt sind. Dies trifft auch auf den in *Hydra vulgaris* identifizierten Notch-Signalweg zu. Dieser ist an der Ausbildung von Gewebegrenzen zwischen Knospe und Elterntier beteiligt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher weiterhin geklärt werden, welche Auswirkungen eine Hemmung des Notch-Signalwegs auf die Ausbildung weiterer Gewebegrenzen in *Hydra* hat, insbesondere derer zwischen Tentakel- und Hypostomgewebe. Dabei sollte die Wirkung des neuen pharmakologischen Hemmstoffes SAHM1 mit der von DAPT verglichen werden.

2 Ergebnisse

2.1 Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden der Klasse B werden an Gewebegrenzen in *Hydra vulgaris* exprimiert

Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Münder, S., & Böttger, A. (2013)

„Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*“

Int J Dev Biol **57** (9-10): 759-765

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ephrin-Signalweg im basalen Mehrzeller *Hydra vulgaris* existiert. Gene für vier Eph-Rezeptoren und drei Klasse B Ephrin-Liganden konnten im Genom des Süßwasserpolyphen identifiziert und aus *Hydra*-cDNA isoliert werden. Alle von diesen Genen kodierten Proteine weisen eine stark konservierte Domänenstruktur auf. Phylogenetische Analysen bestätigten, dass die Liganden aus *Hydra* größere Ähnlichkeit zu den Ephrin-Bs als zu den Ephrin-As aus höher entwickelten Tieren haben. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der Ligandenklasse B um den ursprünglich entstandenen Typus handelt. *In situ* Hybridisierungen ergaben, dass die mRNAs der Rezeptoren und Liganden in den Tentakeln und den Knospen der Tiere exprimiert werden. Der Ephrin-Signalweg scheint in *Hydra* an der dortigen Ausbildung von Gewebegrenzen beteiligt zu sein.

Aus verlagsrechtlichen Gründen enthält die digital veröffentlichte Version dieser Arbeit im Gegensatz zur gedruckten Form nicht die Originalpublikationen.

Publikation 1:

Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Münder, S., & Böttger, A. (2013). **Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*.** *The International Journal of Developmental Biology*, 57 (9-10), 759-765.

doi: 10.1387/ijdb.130158ab

Zugang über Weblink:

<http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.130158ab>

2.2 Notch-vermittelte Signaltransduktion wird für die Kopfregeneration sowie die Musterbildung der Tentakel in *Hydra* benötigt

Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C.,A., Prexl, A., Käsbaue, T., & Böttger, A. (2013).

„Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*“

Dev Biol **383** (1): 146-157.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Notch-Signalweiterleitung auf die Ausbildung von Gewebegrenzen am Kopf von *Hydra vulgaris* untersucht. Adulte Tiere sowie Kopfregenerate wurden mit den pharmakologischen Inhibitoren DAPT und SAHM1 behandelt. Die Hemmung des Notch-Signalwegs verzögert die Kopfregeneration und führt zur Entwicklung von unregelmäßigen Kopfstrukturen. Dabei kommt es zu einer Störung der normalerweise am Kopf der Hydra vorhandenen Genexpressionsmuster. Insbesondere verschoben sich die Grenzen zwischen Tentakel- und Rumpfgewebe. Diese Grenzen konnten während der Kopfregeneration gar nicht ausgebildet werden. Der Notch-Signalweg schien hier zur Sortierung von hypostom- und tentakelspezifischen Vorläuferzellen beizutragen. Die zwei verwendeten Inhibitoren greifen den Notch-Signalweg an unterschiedlichen Punkten an. Da sie gleiche oder ähnliche Veränderungen im Phänotyp der Tiere sowie während der Regeneration bewirkten, konnten die beobachteten Effekte mit großer Zuversicht dem Notch-Signalweg zugeordnet werden.

Aus verlagsrechtlichen Gründen enthält die digital veröffentlichte Version dieser Arbeit im Gegensatz zur gedruckten Form nicht die Originalpublikationen.

Publikation 2:

Münder, S.¹, Tischer, S.¹, Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C., A., Prexl, A., Käsbauer, T., & Böttger, A. (2013). **Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in Hydra.** *Developmental Biology*, 383 (1), 146-157.

doi: 10.1016/j.ydbio.2013.08.022

Zugang über Weblink:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.08.022>

3 Diskussion

3.1 Die Evolution der Ephrin-Gene und ihre Expression in *Hydra vulgaris*

Bislang war unbekannt, ob das System der Eph-Ephrine auch im Genom des Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* vorkommt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein ganzes Netzwerk von mindestens 4 Eph-Rezeptoren und 3 Ephrin-Liganden in *Hydra* existiert. Die Domänenstruktur der Moleküle hat sich dabei im Verlauf der Entwicklung kaum verändert. So weisen die Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden in *Hydra vulgaris* die gleichen charakteristischen Domänen auf wie in höheren Tieren (siehe Ergebnisteil 2.1, Fig. 1). Bei den drei identifizierten Ephrin-Liganden handelt es sich durchweg um Klasse B-Liganden. Dies bestätigt die Theorie, dass es sich bei dieser Klasse um den ursprünglich entstandenen Typus handelt.

„Whole-mount“ *in situ* Hybridisierungen ergaben, dass die Eph-Rezeptoren und die Ephrin-Liganden verstärkt in den „Anhängseln“ der primären Körperachse exprimiert werden. Die Genexpressionen weisen dabei auffällige Ähnlichkeiten zwischen den Knospen und den Tentakeln auf (siehe Ergebnisteil 2.1, Fig. 7).

Solche Übereinstimmungen in den Genexpressionsmustern innerhalb der Tentakel sowie der Knospe finden sich zum Beispiel auch bei den homologen Vertretern der knochenmorphogenetischen Proteine BMP („bone morphogenetic proteins“) sowie Komponenten des Wnt-Signalwegs in *Hydra vulgaris*. Die Gene der BMP Familie sind Teil des TGF- β Signalsystems und spielen eine Rolle für die Ausbildung einer dorso-ventralen Achse. Der in *Hydra* identifizierte Vertreter *HyBMP5-8b* wird verstärkt im unteren Teil des Rumpfes sowie jeweils an der Basis der Knospen und der Tentakel exprimiert (Reinhardt *et al.*, 2004). Komponenten des Wnt-Signalwegs werden hingegen jeweils am apikalen Ende dieser Strukturen verstärkt exprimiert. *HyWnt5* wird zunächst an der Spitze einer sich bildenden Knospe und anschließend in den Spitzen der auswachsenden Tentakel exprimiert (Philipp *et al.*, 2009). Die

Expression des Gens bleibt an den Tentakelspitzen erhalten, während sie an der Spitze der Knospe wieder verschwindet.

Diese Korrelationen haben Hans Meinhardt zu einer interessanten Hypothese geführt, nach welcher die Tentakel und die Knospen von *Hydra vulgaris* einem gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Prozess entsprungen sein könnten (Meinhardt, 2012). Das bedeutet, dass die Tentakel eine modifizierte Form der Knospe darstellen oder umgekehrt. Nach der Theorie von Meinhardt könnten ursprüngliche Knospen nicht mehr abgelöst worden sein und sich dann zu Tentakeln umgewandelt haben, wodurch die Tiere in die Lage versetzt wurden Beute zu fangen.

Eine Modifikation von einzelnen Polypen einer Kolonie zur Anpassung an unterschiedliche Funktionen gibt es tatsächlich bei kolonialen *Cnidariern*, z.B.. *Hydractinia* (siehe Abbildung 5). Hier gibt es innerhalb einer Kolonie sogenannte Fresspolypen (Gastrozoid) die mit Tentakeln ausgestattet sind sowie Geschlechtspolypen (Gonozoid), die für die Fortpflanzung verantwortlich sind oder sogenannte dactylozooid Polypen die etwas größer sind und mit Nematocyten ausgestattet sind, um Feinde abzuwehren.

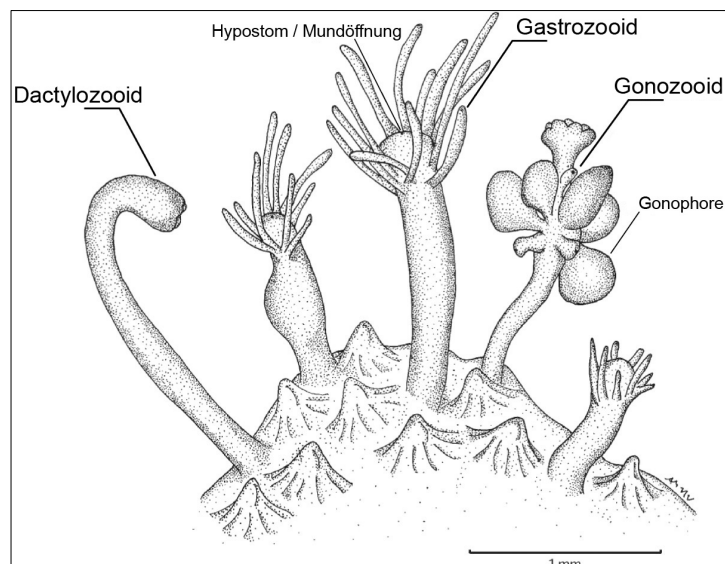


Abbildung 5: Polymorphe Kolonie einer *Hydractinia echinata* mit Verteidigungspolyp (Dactylozoid), Fresspolyp (Gastrozoid) und Geschlechtspolyp (Gonozoid) (verändert nach (Sanders *et al.*, 2014) und (Cartwright and Nawrocki, 2010)).

3.2 Genexpressionsmuster implizieren ursprüngliche Funktionen während der Ausbildung von Gewebegrenzen

3.2.1 Der Ephrin- und der Notch-Signalweg während der Knospung

Die Eph-Rezeptoren und die Ephrin-Liganden werden in den Tentakeln und in der Knospe von *Hydra* auch in Bereichen exprimiert, bei denen es zur Ausbildung einer Gewebegrenze kommt. Die Tentakel stellen differenzierte Strukturen dar, die sich vom Rest des Körpers abgrenzen und die Knospe entwickelt sich zu einem eigenständigen Polypen, der sich vom Muttertier ablöst. Für diesen Prozess spielt der Notch-Signalweg eine bedeutsame Rolle (siehe Einleitung, vgl. (Münder *et al.*, 2010), (Münder *et al.*, 2013)) und es stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen den beiden Signaltransduktionswegen in *Hydra* gibt.

Ein erstes Experiment konnte zeigen, dass die Expression des Ephrin-Liganden *HyEphrin-B1* an der Knospenbasis (siehe Ergebnisteil 2.1) durch die Behandlung mit dem Presenilin-Inhibitor DAPT gehemmt wird. Die Expression des Ephrin-Liganden scheint damit von Notch-Signalen abhängig zu sein.

Ein Zusammenspiel der Notch- und Ephrin-Signalwege ist zum Beispiel auch beim Prozess der Somitogenese bekannt. Dabei wird durch Notch- und bidirektionale Eph-Ephrin Signalweiterleitung die Ausbildung einer Furche zwischen den sich bildenden Somiten sowie eine mesenchymal-epitheliale Transition der Grenzzellen vermittelt (Pasquale, 2005).

Während der Entwicklung von Vertebraten schnüren sich seitlich des Neuralrohrs einzelne Somiten aus dem präsomitischen Mesoderm (PSM) ab und vollziehen damit eine vollständige morphologische Trennung. Aus ihnen gehen später wichtige Strukturen wie Skelettmuskel oder Wirbelkörper hervor (Chong and Jiang, 2005). Neben *Wnt* spielen hier auch mehrere *Notch*-assoziierte Gene eine wichtige Rolle.

An der sich ausbildenden Gewebegrenze müssen Genexpressionsmuster in morphologische Zellveränderungen umgesetzt werden, damit sich der nächste Somite vom PSM abtrennen kann. In der anterioren Hälfte des zukünftigen Somits liegen Notch-aktive Zellen welche eine induktive Kraft zur Segmentierung auf die anterior zu ihnen angrenzenden Zellen ausüben (siehe Abbildung 6 A). Mögliche Effektoren dieser morphologischen Zelltrennung sind abstoßende Kräfte durch die Eph-Ephrine (Takahashi, 2005). In *Danio rerio* wird der Rezeptor *EphA4* jeweils in den anterioren und der Ligand *Ephrin-B2* in den posterioren Hälften der Somiten exprimiert. Beide werden auch als Streifen im angrenzenden und noch unsegmentierten PSM exprimiert (siehe Abbildung 6 B). Die jeweilige Interaktion an den Berührungsflächen zwischen den Segmenten führt zur dortigen Ausbildung von Grenzen (Holder and Klein, 1999).

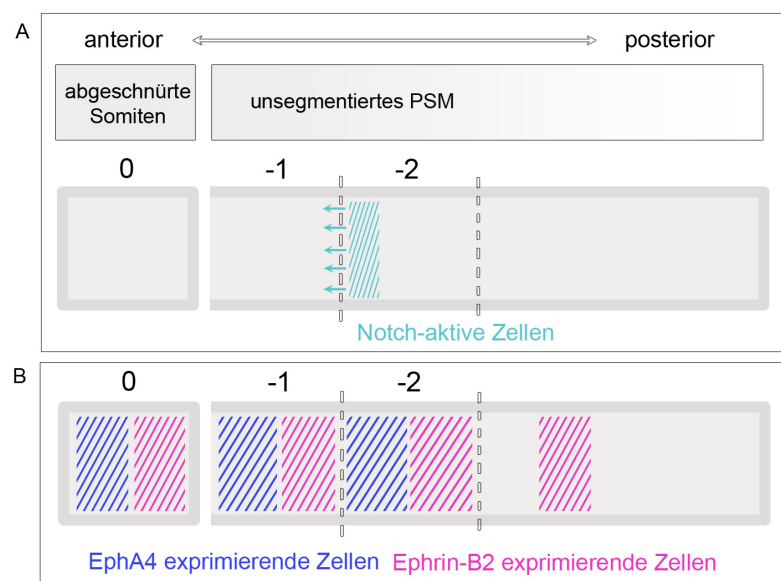


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Notch und den Eph-Ephrinen bei der Somitenabschnürung. (A): Notch-aktive Zellen (türkis) üben eine Segmentierungsaktivität auf die anterior dazu liegenden Grenzzellen des nächsten Somiten aus (kleine Pfeile). (B): Alternierende Expression von *EphA4* (blau) und *Ephrin-B2* (pink) während der Somitogenese in *Danio rerio*. (Bilder frei nach (Takahashi, 2005) und (Holder and Klein, 1999))

Eph-Ephrin Signaltransduktion ist notwendig für die Ausbildung einer intersomitischen Spalte (Durbin *et al.*, 1998) und ist weiterhin auch an der Regulation der mesenchymal-epithelialen Transition der Grenzzellen beteiligt. Dabei hat es einen Einfluss auf die Etablierung der Zellpolarität (Barrios *et al.*, 2003). Die ursprünglich mesenchymalen Grenzzellen wandeln sich zu epithelialen Zellen um und entwickeln eine säulenförmige Gestalt. Durch eine neue Anordnung von Zellkernen, Zentrosomen und Adhäsionskomplexen verändert sich ihre Zellpolarität (siehe Abbildung 7) (Barrios *et al.*, 2003).

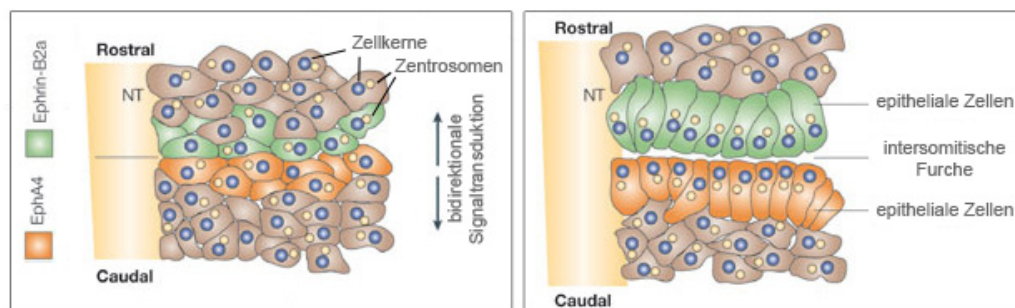


Abbildung 7: Ausbildung einer intersomitischen Furche durch bidirektionale, Ephrin-vermittelte Abstoßung und anschließende Epithelialisierung der mesenchymalen Grenzzellen. Epithelialisierte Zellen (rechts) weisen eine veränderte Polarität der Zellkerne und Zentrosomen auf. NT: Neuralrohr (verändert nach (Pasquale, 2005)).

Die Knospung in *Hydra* weist in gewisser Weise Ähnlichkeiten zu finalen Schritten der Somitogenese von Wirbeltieren auf. Bei beiden Prozessen findet durch Modifikation von zuvor einander ähnlichen Grenzzellen eine morphologische Trennung der Strukturen statt. Bei beiden Vorgängen sind die Zellen im Grenzbereich durch die Expression von Komponenten des Notch- und des Ephrin-Systems gekennzeichnet. Beim Süßwasserpolyphen löst sich die Knospe durch die einseitige Differenzierung von Fußzellen vom Elterntier ab. Bei der Somitogenese entsteht die intersomitische Furche durch beidseitige Zellformveränderungen. So wie bei den letzten Schritten der Somitogenese kommt es auch bei den finalen Schritten der Knospung im Süßwasserpolyphen zu einer morphologischen Umgestaltung der

Grenzzellen und es kommt zur kompletten Trennung von zuvor verbundenem Gewebe.

Für die Differenzierung zu Fußzellen müssen die Grenzzellen ihre Form verändern. Ein erster Versuch konnte zeigen, dass die Überexpression von HyEphrin-B1-GFP zu Formveränderungen in Epithelzellen führt. Dabei kommt es zur Ausbildung von zahlreichen filopodienartigen Strukturen. Solche Filopodien lassen sich auch durch Überexpression von Ephrin-B-GFP in Endothelzellen der Maus induzieren (siehe Abbildung 8) (Sawamiphak *et al.*, 2010).

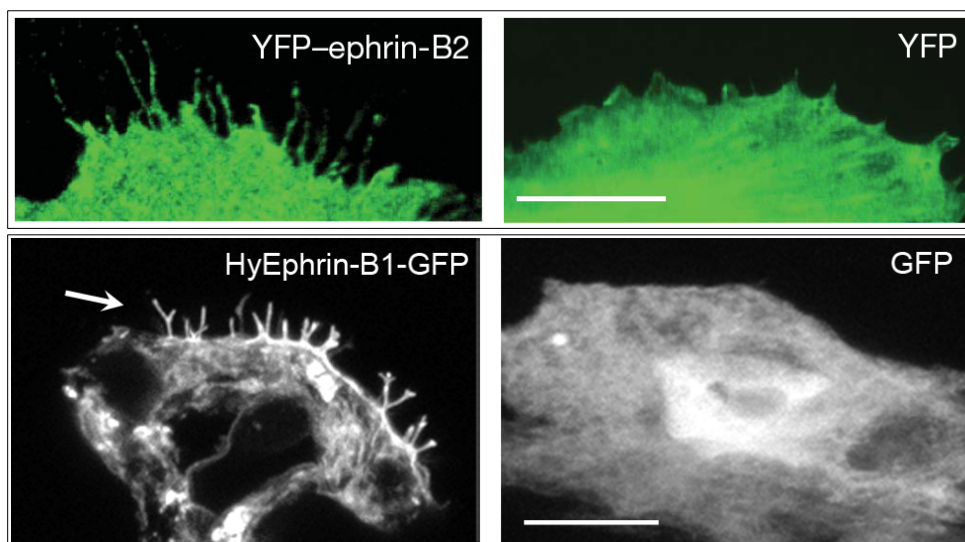


Abbildung 8: (Oben): Ephrin-B2 induzierte Ausbildung filopodialer Fortsätze in primären endothelialen Zellen der Maus (MECs). Vergrößerte Darstellung der Zelloberfläche, Maßstab: 25µm (verändert nach (Sawamiphak *et al.*, 2010)) (Unten): HyEphrin-B1 induzierte filopodiale Ausläufer (Pfeil) in ektodermalen Epithelzellen von *Hydra vulgaris*. Die Bilder zeigen die Projektion mehrerer konfokal aufgenommener Einzelschnitte. Maßstab: 10µm.

HyEphrin-B1 ist beginnend von Stadium 8 an in den ektodermalen Zellen der Knospenbasis exprimiert und verbleibt dort, bis sich die Knospe komplett vom Elterntier löst. Die Expression erscheint dabei immer in den basal liegenden

Grenzzellen, welche sich im Laufe der Entwicklung zu fußspezifischen Zellen differenzieren und sich von den gegenüberliegenden Zellen des Elterntiers abtrennen (siehe Ergebnisteil 2.1, Fig. 6 A-D). Es wäre denkbar, dass der Ephrin-Ligand durch die Beeinflussung der Zellform zur Differenzierung und zur Ablösung der Fußzellen beiträgt.

3.2.2 *Cis*-Inhibierung der Ephrin-Signaltransduktion an den Tentakelbasen

Die Expressionsmuster in Knospe und Tentakeln sind ähnlich jedoch nicht völlig identisch. Im Gegensatz zur Knospenbasis konnte in den Tentakelendodermzellen eine überlappende Expression von Rezeptoren und Liganden detektiert werden. Ephs und Ephrine sind hier also jeweils in denselben Zellen vorhanden. Dieses Verteilungsmuster könnte dazu führen, dass es an den Tentakelbasen zu einer Inhibierung der Signalweiterleitung kommt. Die Bindung von Rezeptor und Ligand auf gegenüberliegenden Zellen in *trans* aktiviert die Signaltransduktion. Befinden sich jedoch beide Moleküle in etwa gleichem Verhältnis auf der Oberfläche derselben Zelle, so können diese auch in *cis* interagieren. Diese Aneinanderlagerung führt zur Inhibierung der anschließenden Signalweiterleitung (Carvalho *et al.*, 2006), (Hornberger *et al.*, 1999). Der Effekt einer *cis*-Inhibierung wurde auch schon für Notch und seinen DSL Liganden, sowie das Signalsystem von Semaphorin und Plexin A beschrieben (siehe Übersichtsartikel (Yaron and Sprinzak, 2012)). Die *cis*-Inhibierung von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden spielt eine Rolle bei der Neurogenese und der gerichteten Wegfindung der Axone.

Eine *cis*-Inhibition der Ephrin-Signalwege ab der Tentakelgrenze erscheint sinnvoll. Wenn die Aktivierung des Ephrin-Systems, bzw. insbesondere der Signaltransduktion des Liganden *HyEphrin-B1* an der Knospenbasis zu Zellformveränderungen führt und die Ablösung der Knospe vom Elterntier begünstigt, dann sollte dieser Mechanismus nicht im gleichen Maße an den Tentakeln zum tragen kommen. Die Tentakel werden im Gegensatz zur Knospe nicht vom Tier

abgetrennt sondern bleiben fest mit diesem verbunden. Aufgrund einer Inhibition durch *cis*-Interaktion könnte die Ablösung der Struktur verhindert werden (siehe Abbildung 9). Demnach würden Tentakel durch einen modifizierten Knospungsprozess entstehen, bei welchem jedoch die finale Ablösung unterdrückt wird (vgl. (Meinhardt, 2012)).

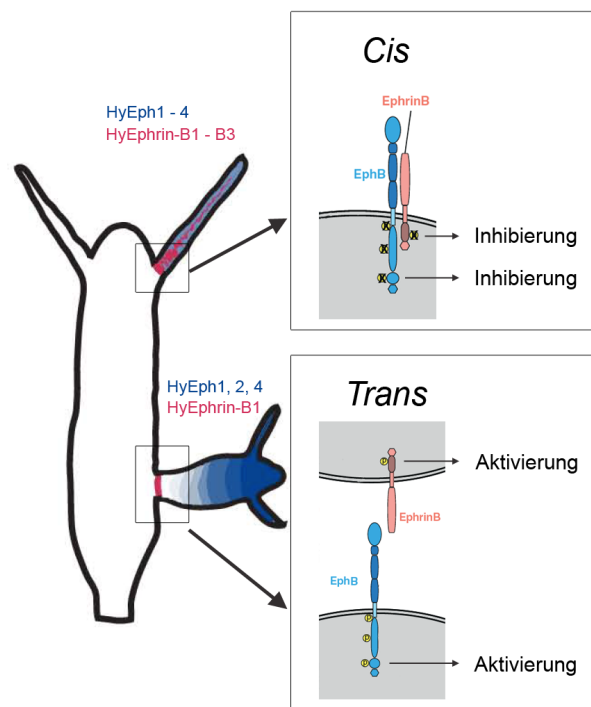


Abbildung 9: Expressionsmuster von Ephrin-Liganden und Eph-Rezeptoren implizieren *cis*- und *trans*-Interaktionen. (Oben): Die *cis*-Interaktion an den Tentakelbasen führt zur Inhibition der Signalweiterleitung. Die Tentakel bleiben mit dem Tier verbunden. (Unten): Eine Interaktion in *trans* an der Knospenbasis führt hingegen zur Aktivierung der Kinaseaktivität und damit einem Teil der Signaltransduktion sowie der nachgeschalteten Effekte. Die Knospe löst sich vom Elterntier ab (Bilder verändert nach (Tischer *et al.*, 2013) und (Yaron and Sprinzak, 2012)).

3.3 Inhibierung des Notch-Signalwegs durch DAPT und SAHM1

Bislang war für die Untersuchungen zur Ausbildung von Gewebegrenzen im Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* der Presenilin Inhibitor DAPT verwendet worden. Durch die Hemmung des Presenilins wird die Signalweiterleitung durch den Notch-Rezeptor gehemmt, da dieser nicht mehr prozessiert wird. Presenilin ist jedoch in der Lage zahlreiche weitere Substrate zu prozessieren (Haapasalo and Kovacs, 2011) wozu auch die Eph-Rezeptoren und Ephrine zählen (Tomita *et al.*, 2006), (Georgakopoulos *et al.*, 2006), (Litterst *et al.*, 2007), (Waschbüsch *et al.*, 2009), (Inoue *et al.*, 2009). Da die Ephrine ausgehend von den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen auch an der Ausbildung von Knospen und Tentakeln in *Hydra* beteiligt sind, war es notwendig nach weiteren Inhibitoren der Notch-Signalweiterleitung zu suchen. Neben dem schon bekannten DAPT wurde der neu entwickelte Hemmstoff SAHM1 für die Untersuchung der Kopfstrukturen in *Hydra* verwendet.

Die beiden Inhibitoren erzeugen trotz ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise viele ähnliche Effekte. Beide Hemmstoffe führen bei adulten Tieren zur Ausbildung von unregelmäßigen Kopfstrukturen. Bei der Behandlung mit SAHM1 entstehen Tiere, deren Tentakel aus der eigentlichen Tentakelzone herauswandern. Zusätzlich bilden zahlreiche Tentakel Verzweigungen an ihrem apikalen Ende (siehe Ergebnisteil 2.2 Fig. S3). Diese zwei Effekte werden ebenso durch eine Behandlung mit DAPT verursacht. DAPT-behandelte Tiere entwickeln jedoch noch viel stärker ausgeprägte Unregelmäßigkeiten (siehe Ergebnisteil 2.2. Fig. 1A).

Die Anwendung sowohl von DAPT als auch von SAHM1 führt zu einer Verzögerung der Kopfregeneration. Nach dem Absetzen von DAPT entwickeln sich hauptsächlich Kopfstrukturen, die durch eine übermäßige Ausprägung von Tentakelgewebe gekennzeichnet sind. Dieser Effekt erklärt sich durch eine Betrachtung der Genexpressionsmuster. In DAPT-behandelten Kopfregeneraten findet eine übermäßige Expression von tentakelspezifischen Genen auf Kosten von hypostomspezifischen Genen statt. Aufgrund dessen entwickelt sich anschließend Tentakelgewebe aus den Vorläuferzellen der regenerierenden Kappe.

Auch bei SAHM1 wird die Kopfregeneration über die gesamte Dauer der Behandlung gehemmt. Nach Absetzen des Hemmstoffs bilden sich jedoch morphologisch unauffällige Kopfstrukturen aus. Auch dieser Effekt erklärt sich aus den Genexpressionsmustern. Im Gegensatz zu DAPT-behandelten Regeneraten werden hier sowohl tentakel-, als auch hypostomspezifische Gene weiterhin exprimiert. Die Expressionsmuster sind jedoch auch nach 48 Stunden nicht voneinander getrennt, sondern bleiben überlappend wie in den Anfangsstadien der Kopfregeneration. Für diesen Unterschied in der Wirkung von DAPT und SAHM1 auf die Kopfregeneration gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits könnte die Hemmungswirkung durch SAHM1 schlichtweg geringer ausfallen, als es bei DAPT der Fall ist. Andererseits könnte es sein, dass die stärkere Ausprägung bei DAPT-behandelten Tieren zum Teil nicht nur durch Notch- sondern zusätzlich durch Presenilin-abhängige Effekte verursacht wird. Somit würde der mit SAHM1 erzielte Phänotyp den eigentlichen Notch-„loss of function“ reflektieren. Presenilin könnte Notch-unabhängig in die Prozessierung von Eph-Rezeptoren (Litterst *et al.*, 2007), Ephrin-Liganden (Tomita *et al.*, 2006) oder Cadherinen involviert sein (Marambaud *et al.*, 2002).

In *Hydra* ist bislang nicht bekannt mit welchen Komponenten die NICD einen transkriptionsaktivierenden Komplex bildet. Im Genom des Süßwasserpolyphen existiert der CSL-Transkriptionsfaktor HvSu(H) („Suppressor of hairless“) (Käsbauer *et al.*, 2007). Daneben konnte auch ein vielversprechender Kandidat für ein Homolog eines „Mastermind“ Proteins identifiziert werden (Kooperation mit J. Söding, Metazome Datenbank, Hma2.212411).

Neben Genen wie *notch* oder *hes* konnte im Verlauf der Kopfregeneration auch die Expression eines Eph-Rezeptors (*HyEph1*) nachgewiesen werden. Der Notch-Signalweg spielt vermutlich eine Rolle für die Sortierung der Epithelzellen der regenerierenden Kappe (vgl. Modell im Ergebnisteil 2.2, Fig. 7B). Das System der Ephrine könnte hier beteiligt sein. In der regenerierenden Kappe befinden sich zunächst gleichzeitig Tentakel- sowie Hypostomvorläuferzellen. Der Prozess der Regeneration verläuft morphallaktisch, das bedeutet, es werden keine Zellteilungen benötigt. Die Aufteilung in die zwei Bereiche muss also entweder durch Veränderung der Genexpression der einzelnen Zellen oder durch ihre Sortierung passieren.

Ähnlich wie bei der Ausbildung von verschiedenen Rhombomeren während der Entwicklung des Nachhirns von Wirbeltieren, könnte das Ephrin-System durch abstoßende Effekte eine Zellmigration und damit eine Sortierung der Genexpressionsbereiche bewirken.

4 Ausblick

Weitere Untersuchungen am Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* können das Verständnis der ursprünglich ausgeübten Funktionen der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden verbessern. Dazu sollte überprüft werden, ob Hemmstoffe des Ephrin-Signalwegs (siehe Übersichtsartikel (Noberini *et al.*, 2012)), wie zum Beispiel Lithocholsäure (Giorgio *et al.*, 2011) auch in *Hydra vulgaris* verwendet werden können. Die Hemmung der Signaltransduktion kann weiteren Aufschluss über die Auswirkungen der Ephrine beim Prozess der Knospung oder während der Kopfregeneration geben. Weiterhin wäre interessant, ob auch im Bereich des Kopfes der Tiere ein Zusammenhang zwischen dem Notch- und dem Ephrin-Signalweg besteht. *In situ* Hybridisierungsreaktionen können untersuchen, ob sich durch eine Behandlung mit DAPT die Genexpressionen der Eph-Ephrine am Kopf der Tiere verändern. Da Presenilin auch Komponenten des Ephrin-Signalwegs prozessiert, sollte hier insbesondere auch der Inhibitor SAHM1 zur Anwendung kommen. Auch der Einfluss von SAHM1 auf den Prozess der Knospung muss untersucht werden.

5 Anhang

5.1 Referenzen

Adams, R. H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U. and Klein, R. (2001), "The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration." *Cell* **104**(1): 57-69.

Barrios, A., Poole, R. J., Durbin, L., Brennan, C., Holder, N. and Wilson, S. W. (2003), "Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis." *Curr Biol* **13**(18): 1571-82.

Bartley, T. D., Hunt, R. W., Welcher, A. A., Boyle, W. J., Parker, V. P., Lindberg, R. A., Lu, H. S., Colombero, A. M., Elliott, R. L., Guthrie, B. A. and et al. (1994), "B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase." *Nature* **368**(6471): 558-60.

Battle, E. and Wilkinson, D. G. (2012), "Molecular mechanisms of cell segregation and boundary formation in development and tumorigenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(1): a008227.

Bode, H. R. (2003), "Head regeneration in Hydra." *Dev Dyn* **226**(2): 225-36.

Bode, H. R. (2012), "The head organizer in Hydra." *Int J Dev Biol* **56**(6-8): 473-8.

Bray, S. J. (2006), "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 678-89.

Broun, M. and Bode, H. R. (2002), "Characterization of the head organizer in hydra." *Development* **129**(4): 875-84.

Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B. and Bode, H. R. (2005), "Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway." *Development* **132**(12): 2907-16.

Browne, E. N. (1909), "The production of new hydranths in Hydra by the insertion of small grafts." *Journal of Experimental Zoology* **7**(1): 1-23.

Campbell, R. D. (1967), "Tissue dynamics of steady state growth in Hydra littoralis. II. Patterns of tissue movement." *J Morphol* **121**(1): 19-28.

- Cartwright, P. and Nawrocki, A. M. (2010), "Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria)." *Integr Comp Biol* **50**(3): 456-72.
- Carvalho, R. F., Beutler, M., Marler, K. J., Knoll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T. and Drescher, U. (2006), "Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5." *Nat Neurosci* **9**(3): 322-30.
- Chong, S. W. and Jiang, Y. J. (2005), "Off limits--integrins holding boundaries in somitogenesis." *Trends Cell Biol* **15**(9): 453-7.
- Cowan, C. A. and Henkemeyer, M. (2001), "The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals." *Nature* **413**(6852): 174-9.
- Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P. F., Murphy, M., Kontgen, F. and Boyd, A. W. (1998), "EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13248-53.
- Drescher, U. (2002), "Eph family functions from an evolutionary perspective." *Curr Opin Genet Dev* **12**(4): 397-402.
- Durbin, L., Brennan, C., Shiomi, K., Cooke, J., Barrios, A., Shanmugalingam, S., Guthrie, B., Lindberg, R. and Holder, N. (1998), "Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites." *Genes Dev* **12**(19): 3096-109.
- Elowe, S., Holland, S. J., Kulkarni, S. and Pawson, T. (2001), "Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7429-41.
- Eph-Nomenclature-Committee. (2001). "Table1: Nomenclature for the Eph receptor and ephrin families." from https://epf-nomenclature.med.harvard.edu/table_1.html.
- Gee, L., Hartig, J., Law, L., Wittlieb, J., Khalturin, K., Bosch, T. C. and Bode, H. R. (2010), "beta-catenin plays a central role in setting up the head organizer in hydra." *Dev Biol* **340**(1): 116-24.
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L. and Haass, C. (2002), "A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish." *EMBO Rep* **3**(7): 688-94.
- Georgakopoulos, A., Litterst, C., Ghersi, E., Baki, L., Xu, C., Serban, G. and Robakis, N. K. (2006), "Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling." *EMBO J* **25**(6): 1242-52.

Giorgio, C., Hassan Mohamed, I., Flammini, L., Barocelli, E., Incerti, M., Lodola, A. and Tognolini, M. (2011), "Lithocholic acid is an Eph-ephrin ligand interfering with Eph-kinase activation." PLoS One **6**(3): e18128.

Haapasalo, A. and Kovacs, D. M. (2011), "The many substrates of presenilin/gamma-secretase." J Alzheimers Dis **25**(1): 3-28.

Hall, A. (1998), "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-14.

Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. and Takaku, F. (1987), "A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene." Science **238**(4834): 1717-20.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. and Holstein, T. W. (2000), "WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra." Nature **407**(6801): 186-9.

Holder, N. and Klein, R. (1999), "Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis." Development **126**(10): 2033-44.

Hori, K., Sen, A. and Artavanis-Tsakonas, S. (2013), "Notch signaling at a glance." J Cell Sci **126**(Pt 10): 2135-40.

Hornberger, M. R., Dutting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., Tanaka, H. and Drescher, U. (1999), "Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons." Neuron **22**(4): 731-42.

Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., Matsui, C., Arita, K., Katahira-Tayama, S., Sato, T., Yamauchi, E., Oda, Y. and Takai, Y. (2009), "Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation." J Cell Biol **185**(3): 551-64.

Jones, T. L., Chong, L. D., Kim, J., Xu, R. H., Kung, H. F. and Daar, I. O. (1998), "Loss of cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos mediated by the cytoplasmic domain of XLerk, an erythropoietin-producing hepatocellular ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 576-81.

Jurney, W. M., Gallo, G., Letourneau, P. C. and McLoon, S. C. (2002), "Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse." J Neurosci **22**(14): 6019-28.

Käsbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C. N., Dall'armi, E., Staudigl, A., Stiening, B. and Böttger, A. (2007), "The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*." *Dev Biol* **303**(1): 376-90.

Klein, R. (2012), "Eph/ephrin signalling during development." *Development* **139**(22): 4105-9.

Kullander, K., Croll, S. D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T. M., Klein, R., Yancopoulos, G. D. and Gale, N. W. (2001), "Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control." *Genes Dev* **15**(7): 877-88.

Kullander, K. and Klein, R. (2002), "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 475-86.

Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., Law, L., Schmidt, H. A., Ozbek, S., Bode, H. and Holstein, T. W. (2009), "Multiple Wnts are involved in *Hydra* organizer formation and regeneration." *Dev Biol* **330**(1): 186-99.

Litterst, C., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Gherzi, E., Wisniewski, T., Wang, R., Ludwig, A. and Robakis, N. K. (2007), "Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor." *J Biol Chem* **282**(22): 16155-63.

Lu, Q., Sun, E. E., Klein, R. S. and Flanagan, J. G. (2001), "Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction." *Cell* **105**(1): 69-79.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. and Robakis, N. K. (2002), "A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions." *EMBO J* **21**(8): 1948-56.

Marston, D. J., Dickinson, S. and Nobes, C. D. (2003), "Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion." *Nat Cell Biol* **5**(10): 879-88.

Meinhardt, H. (2012), "Modeling pattern formation in hydra: a route to understanding essential steps in development." *Int J Dev Biol* **56**(6-8): 447-62.

Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E. and Wang, B. (2000), "Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation." *Nat Cell Biol* **2**(2): 62-9.

Miao, H., Wei, B. R., Peehl, D. M., Li, Q., Alexandrou, T., Schelling, J. R., Rhim, J. S., Sedor, J. R., Burnett, E. and Wang, B. (2001), "Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway." *Nat Cell Biol* **3**(5): 527-30.

Micchelli, C. A., Esler, W. P., Kimberly, W. T., Jack, C., Berezovska, O., Kornilova, A., Hyman, B. T., Perrimon, N. and Wolfe, M. S. (2003), "Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*." *FASEB J* **17**(1): 79-81.

Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N., Del Bianco, C., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Kung, A. L., Gilliland, D. G., Verdine, G. L. and Bradner, J. E. (2009), "Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex." *Nature* **462**(7270): 182-8.

Mosch, B., Reissenweber, B., Neuber, C. and Pietzsch, J. (2010), "Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis." *J Oncol* **2010**: 135285.

Münder, S., Käsbauer, T., Prexl, A., Aufschnaiter, R., Zhang, X., Towb, P. and Böttger, A. (2010), "Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*." *Dev Biol* **344**(1): 331-45.

Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Buchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C. A., Prexl, A., Käsbauer, T. and Böttger, A. (2013), "Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*." *Dev Biol* **383**(1): 146-57.

Murai, K. K. and Pasquale, E. B. (2003), "'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk." *J Cell Sci* **116**(Pt 14): 2823-32.

Noberini, R., Lamberto, I. and Pasquale, E. B. (2012), "Targeting Eph receptors with peptides and small molecules: progress and challenges." *Semin Cell Dev Biol* **23**(1): 51-7.

Nobes, C. D. and Hall, A. (1995), "Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility." *Biochem Soc Trans* **23**(3): 456-9.

Noren, N. K. and Pasquale, E. B. (2004), "Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins." *Cell Signal* **16**(6): 655-66.

Otto, J. J. and Campbell, R. D. (1977), "Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map." *J Exp Zool* **200**(3): 417-28.

Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. and Klein, R. (2002), "EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase." *Mol Cell* **9**(4): 725-37.

Pasquale, E. B. (2005), "Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 462-75.

Philipp, I., Aufschnaiter, R., Ozbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., Watanabe, H., Rentzsch, F., Holstein, T. W. and Hobmayer, B. (2009), "Wnt/beta-catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan Hydra." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(11): 4290-5.

Prexl, A., Münder, S., Loy, B., Kremmer, E., Tischer, S. and Böttger, A. (2011), "The putative Notch ligand HyJagged is a transmembrane protein present in all cell types of adult Hydra and upregulated at the boundary between bud and parent." *BMC Cell Biol* **12**: 38.

Reinhardt, B., Broun, M., Blitz, I. L. and Bode, H. R. (2004), "HyBMP5-8b, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in hydra." *Dev Biol* **267**(1): 43-59.

Ribon, V., Herrera, R., Kay, B. K. and Saltiel, A. R. (1998), "A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions." *J Biol Chem* **273**(7): 4073-80.

Sanders, S. M., Shcheglovitova, M. and Cartwright, P. (2014), "Differential gene expression between functionally specialized polyps of the colonial hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* (Phylum Cnidaria)." *BMC Genomics* **15**: 406.

Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T. and Acker-Palmer, A. (2010), "Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis." *Nature* **465**(7297): 487-91.

Song, J., Vranken, W., Xu, P., Gingras, R., Noyce, R. S., Yu, Z., Shen, S. H. and Ni, F. (2002), "Solution structure and backbone dynamics of the functional cytoplasmic subdomain of human ephrin B2, a cell-surface ligand with bidirectional signaling properties." *Biochemistry* **41**(36): 10942-9.

Steele, R. E., David, C. N. and Technau, U. (2011), "A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution." *Trends Genet* **27**(1): 7-13.

Stein, E., Lane, A. A., Cerretti, D. P., Schoecklmann, H. O., Schroff, A. D., Van Etten, R. L. and Daniel, T. O. (1998), "Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses." *Genes Dev* **12**(5): 667-78.

Takahashi, Y. (2005), "Common mechanisms for boundary formation in somitogenesis and brain development: shaping the 'chic' chick." *Int J Dev Biol* **49**(2-3): 221-30.

- Tanaka, M., Kamo, T., Ota, S. and Sugimura, H. (2003), "Association of Dishevelled with Eph tyrosine kinase receptor and ephrin mediates cell repulsion." *EMBO J* **22**(4): 847-58.
- Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Münder, S. and Böttger, A. (2013), "Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*." *Int J Dev Biol* **57**(9-10): 759-65.
- Tomita, T., Tanaka, S., Morohashi, Y. and Iwatsubo, T. (2006), "Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1." *Mol Neurodegener* **1**: 2.
- Wang, H. U., Chen, Z. F. and Anderson, D. J. (1998), "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." *Cell* **93**(5): 741-53.
- Waschbüsch, D., Born, S., Niediek, V., Kirchgessner, N., Tamboli, I. Y., Walter, J., Merkel, R. and Hoffmann, B. (2009), "Presenilin 1 affects focal adhesion site formation and cell force generation via c-Src transcriptional and posttranslational regulation." *J Biol Chem* **284**(15): 10138-49.
- Watanabe, H., Schmidt, H. A., Kuhn, A., Hoger, S. K., Kocagoz, Y., Laumann-Lipp, N., Ozbek, S. and Holstein, T. W. (2014), "Nodal signalling determines biradial asymmetry in *Hydra*." *Nature* **515**(7525): 112-5.
- Yaron, A. and Sprinzak, D. (2012), "The cis side of juxtacrine signaling: a new role in the development of the nervous system." *Trends Neurosci* **35**(4): 230-9.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003), "EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion." *Nat Cell Biol* **5**(10): 869-78.

5.2 Abkürzungen

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
BMP	bone morphogenetic protein
C-	Carboxy-
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenylacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t-butyl ester
DSL	Delta/Serrate/Lag
Eph	Eph-Rezeptor
Ephrin	Ephrin-Ligand (<u>E</u> ph family <u>r</u> eceptor <u>i</u> nteraction protein)
FGF	Fibroblast Growth Factor
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
HES	Hairy Enhancer of Split
MAML	Mastermind-like
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
PDZ	postsynaptic density protein, discs large, zona occludens
PSM	präsomitisches Mesoderm
PTP-BL	Protein-Tyrosin-Phosphatase basophil like
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RGS	Regulator of G-protein signaling
Rho	Ras homologue
SAHM1	stapled alpha-helical peptides derived from MAML1
SAM	sterile alpha motif
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SH	Src-homology
Src	sarcoma

5.3 Publikationen

Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Munder, S., & Böttger, A. (2013). Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*. *The International Journal of Developmental Biology*, 57 (9-10), 759.

Munder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C., A., Prexl, A., Käsbauer, T., & Böttger, A. (2013). Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*. *Developmental Biology*, 383 (1), 146-157.

Prexl, A., Munder, S., Loy, B., Kremmer, E., Tischer, S., & Böttger, A. (2011). The putative Notch ligand HyJagged is a transmembrane protein present in all cell types of adult *Hydra* and upregulated at the boundary between bud and parent. *BMC Cell Biology*, 12 (1), 38.

5.4 Erklärung zum Eigenanteil

Ergebnisteil 2.1:

Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Münder, S., & Böttger, A. (2013). Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*. *The International Journal of Developmental Biology*, 57 (9-10), 759.

Ich habe die gezeigten Experimente geplant und durchgeführt. Dabei hat Mona Reineck einen Teil der Experimente (Ephrin-Liganden) im Rahmen ihrer von mir betreuten Masterarbeit mitgeplant und durchgeführt. Ich habe die Abbildungen erstellt und das Manuskript mit Hilfe von Angelika Böttger geschrieben.

Ergebnisteil 2.2:

Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C., A., Prexl, A., Käsbauser, T., & Böttger, A. (2013). Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*. *Developmental Biology*, 383 (1), 146-157.

Ich habe einen Teil der Experimente zur Kopfregeneration zusammen mit Sandra Münder durchgeführt (phänotypische Regeneration, *in situ* Hybridisierungen *HyAlx*, *HyWnt3*, *HyßCatenin*). Alle SAHM1-Inhibitor Experimente wurden von mir geplant und durchgeführt und die zugehörigen Abbildungen erstellt (Fig. 2B, S1C, S3, S5). Ich habe einen Teil der Diagramme erstellt (Fig.1A, 2, S3). Ich habe Fig. 7 (Modell) gemeinsam mit Angelika Böttger erstellt. Ich habe geholfen das finale Manuskript und alle finalen Abbildungen zu erstellen.

5.5 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Angelika Böttger dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat Teil ihres Labors und ihrer Arbeitsgruppe zu sein. Danke für die gute Zusammenarbeit und einfach eine tolle Zeit innerhalb sowie außerhalb der Universität.

Dankeschön an alle Mitglieder der Prüfungskommission für ihre Zeit, insbesondere für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Rob Steele, Celina Juliano, Adrian Reich, Johannes Söding und vor allem bei Mona Reineck für ihre großartige Arbeit und die Begeisterung für das Ephrin Projekt bedanken.

Danke an alle ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter der AG Böttger, AG Wolf sowie AG MacWilliams. Besonders meine lieb gewonnenen „letzten“ Kolleginnen Mona, Erika, Christina und Astrid möchte ich hier nicht vergessen. Ebenfalls Danke für alles an Charlie, Sandra, Andrea, Alex, Katha, Lisa und Julia. Es war eine lehrreiche aber auch lustige Zeit und ich werde die Arbeit genauso in Erinnerung behalten wie die Faschingskrapfen, Syltexkursionen, Nebelwanderungen oder winterliche Bergtouren.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Christoph, meinen Freunden und der Familie bedanken. Ohne euch wäre die Welt nur halb so schön.